

А. С. Лагодич, А. К. Жерносек

**ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕПАТИТА С****Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь**

Цель работы – обзор химической структуры и её связи с фармакологической активностью лекарственных средств для лечения гепатита С.

В статье приведена информация о строении и жизненном цикле вируса гепатита С, а также классификация лекарственных средств для лечения гепатита С. Описано химическое строение и показана связь структуры и действия для лекарственных средств непрямого (пегилированный интерферон альфа, рибавирин) и прямого действия. Существует три основных класса противовирусных лекарственных средств прямого действия для лечения гепатита С: ингибиторы протеазы NS3/NS4a первого поколения (боцепревир, телапревир) и второго поколения (асунапревир, grazопревир, парлапревир, паритапревир, симепревир); ингибиторы белка NS5a (велпатасвир, даклатасвир, ледипасвир, омбитасвир, эбасвир); нуклеозидные (софосбувир) и ненуклеозидные (дасабувир) ингибиторы NS5b полимеразы.

Ключевые слова: *вирус гепатита С, гепатит С, противовирусные лекарственные средства прямого действия, ингибиторы протеазы NS3/NS4a, ингибиторы белка NS5a, ингибиторы NS5b полимеразы, связь структуры и действия.*

ВВЕДЕНИЕ

Гепатит С – наиболее тяжёлая форма вирусного гепатита, которая характеризуется относительно быстрой по времени хронизацией процесса и развитием цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Вирус гепатита С (HCV) был открыт в начале 1970-х годов как вирус, вызывающий «ни А – ни В гепатит». В 1990 г. с развитием химической генетики и возможности осуществления молекулярно-генетических методов появились первые представления о геноме HCV. В 1990–2001 гг. открыты «основные» белки HCV. В 2001 г. было доказано, что центральную роль в репликации вируса играет неструктурный белок NS5b, представляющий собой РНК-зависимую РНК-полимеразу.

До 2011 г. стандартом медицинской помощи для пациентов, инфицированных HCV, была комбинированная терапия пегилированным интерфероном-α (Peg-IFNα) и рибавирином в течение 24 недель (генотипы HCV 2 и 3) или 48 недель (генотипы HCV 1, 4-7). Однако эффективность комбинации Peg-IFNα/рибавирин снизилась у пациентов, инфицированных генотипом 1 (до 40 %) и у носителей HCV с генотипом 2 и 3 (до 46 %). Кроме того, появление серьёзных и опасных для жизни побочных реакций, таких как депрессия, гриппоподобный синдром, гемолитическая анемия, заставило многих пациентов прекратить лечение [1–3].

В начале 2010-х годов разработано первое поколение лекарственных средств (ЛС) прямого действия, ингибирующих вирусный белок NS3/NS4a, играющий ключевую роль в репликации вируса, что позволило использовать их в качестве монотерапии и в ряде случаев избегать применения комбинации Peg-IFNα/рибавирин. В 2011 г. зарегистрирован первый ингибитор NS3/NS4a, боцепревир, разработанный компанией Шеринг-Плау. Столь позднее появление данных ЛС объясняется трудностями в создании надёжной системы культивирования клеток *in vitro*, способной поддерживать процесс репликации, и в отсутствии удобной модели животных, необходимой для оценки эффективности лекарств *in vivo* [4–6]. В процессе разработки ингибиторов NS3/NS4a большое количество соединений, полученных путём классического скрининга, не прошло клинических испытаний, а наличие необычайно маленького субстрат-связывающего участка в белке привело к дополнительным трудностям при создании ЛС на основе пептидомиметиков. Ингибиторы NS3/NS4a должны быть низкомолекулярными соединениями пептидной природы, иметь гибкую структуру для компактного размещения в белковых «связывающих карманах», быть способны к образованию дополнительных водородных и гидрофобных связей, повышающих избирательность отно-

сительно других протеаз [7, 8].

В течение 2013–2018 гг. внедрены в клиническую практику ЛС для лечения гепатита С с различными механизмами противовирусного действия, обладающие улучшенным профилем эффективности и переносимости.

Цель работы – обзор химической структуры и её связи с фармакологической активностью лекарственных средств для лечения гепатита С.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы публикации в специализированных изданиях и сети Интернет. Применялись методы исследования: контент-анализ, синтез, сравнение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Строение и жизненный цикл вируса гепатита С

HCV относится к семейству *Flaviviridae*, род *Hepacivirus*. Его геном представлен «+»

однонитевой РНК, защищенной нуклеокапсидом (кор-белок) и специальной оболочкой. Основные антигены вируса представлены мажорными (E1, E2, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b) и минорными протеинами (пептид p7 и белок F). Роль минорных белков мало изучена. Особенности строения и функции белков HCV показаны в таблице 1. Белки E1 и E2 являются структурными белками HCV, остальные – неструктурными (NS).

При попадании в кровь HCV связывается с липопротеинами очень низкой плотности (ЛПОНП) или липопротеинами низкой плотности (ЛПНП), только около 20% вирусов находится в свободном состоянии и через рецептор к ЛПНП проникает в гепатоциты. При взаимодействии с рецепторами клеток печени HCV образует комплекс «вирус-рецептор», который попадает внутрь клетки через образование эндоцитозной вакуоли. В дальнейшем вакуоль сливается с эндосомой (цитоплазматической везикулярной структурой клетки), характеризующейся низкими значе-

Таблица 1. – Белки вируса гепатита С

Белки	Структура и функции
E1 и E2	Входят в состав защитной липидно-протеиновой оболочки. Обеспечивают устойчивость HCV к различным неблагоприятным факторам благодаря наличию в своём строении дисульфидных связей и большому количеству олигосахаридов разнообразной структуры.
NS2	Единственная изученная функция состоит в отщеплении сериновой протеазы HCV. NS2 ковалентно связывается с участком полипротеина, соответствующим NS3. Образуется цистеиновая протеаза, расщепляющая связь между NS2 и NS3, а также между NS3 и полипротеином. NS2 фосфорилируется и деградирует, а NS3 взаимодействует с NS4a, образуя сериновую протеазу.
NS3	Обладает протеазной активностью. В активном центре содержатся остатки гистидина, аспарагина и серина. Кроме протеазной активности, у NS3 имеется хеликазная / нуклеозидтрифосфатазная активность, необходимая для АТФ-зависимого раскручивания высокоупорядоченных участков и разъединения комплексов РНК.
NS4a	Является кофактором в комплексе NS3 и NS4a, обеспечивает фолдинг протеина NS3 и удержание сериновой протеазы около мембраны ЭПР. Одной из самых важных функций комплекса NS3 и NS4a является нарушение клеточной антивирусной защиты.
NS4b	Белок с консервативной первичной структурой и редкой модификацией двух цистеиновых остатков (сульфгидрильные группы этерифицированы пальмитиновой кислотой). Такая модификация способствует полимеризации NS4b, приводящей к созданию мембранно-ассоциированной платформы для репликативного комплекса HCV.
NS5a	Выполняет роль ключевого регулятора репликации, имеет пространственную структуру с тремя хорошо выраженными доменами. Первый домен ответственен за образование димера NS5a, формирующего платформу для связывания РНК и транспорта её к репликативному центру. Второй домен содержит участок, определяющий чувствительность к интерферону. Третий домен содержит консервативные и вариабельные участки. Особенностью NS5a является наличие фосфорилированных цепей, богатых пролином.
NS5b	Обладает активностью РНК-зависимой РНК-полимеразы, способной инициировать синтез РНК как с использованием праймера, так и без него. Активный центр фермента имеет два остатка аспарагиновой кислоты, координационно связывающие ионы Mg^{2+} , которые необходимы на стадии транскрипции и трансляции.

ниями рН. В кислой среде происходит гидролиз пептидных и гликозидных связей в структурных гликопротеинах и протеинах, что запускает процесс слияния фосфолипидного слоя вируса и мембраны эндосомы, а РНК HCV выходит в цитоплазму клетки. Непосредственно репликация и морфогенез вируса происходят в эндоплазматическом ретикулуле гепатоцитов. Для РНК вируса характерны участки с высокой частотой мутаций; короткие 5'- и 3'-концевые нетранслируемые области, обеспечивающие заправку для инициации синтеза РНК, и уникальная открытая рамка считывания. Открытая рамка считывания кодирует единственный белок-предшественник, называемый полипротеином. В результате ко- и посттрансляционного протеолитического расщепления полипро-

теина и процессинга продуктов образуются структурные и неструктурные белки. После синтеза белковых компонентов и РНК происходит сборка вируса и выход его вместе с ЛПОП в кровь [9–11].

2. Классификация противовирусных лекарственных средств для лечения гепатита С

Среди противовирусных ЛС для лечения гепатита С различают ЛС прямого и непрямого действия. К первым относятся рибавирин и Peg-IFN α , обладающие широким спектром активности. Представителями вторых (таблица 2) являются лекарственные средства, влияющие непосредственно на вирусные белки (NS3/NS4a, NS5a, NS5b).

Таблица 2. – Классификация лекарственных средств прямого действия для лечения гепатита С

Группы	Лекарственные средства
<i>Ингибиторы протеазы NS3/ NS4a («превир»)»</i>	
I поколение	Боцепревир, телапревир
II поколение	Асунапревир, grazопревир, налпревир, паритапревир, симепревир
<i>Ингибиторы белка NS5a («асвир»)»</i>	Велпатасвир, даклатасвир, ледипасвир, омбитасвир, элбасвир
<i>Ингибиторы NS5b полимеразы («бувир»)»</i>	
Нуклеозидные	Софосбувир
Ненуклеозидные	Дасабувир

3. Связь структуры и действия лекарственных средств для лечения гепатита С

Лекарственные средства непрямого действия

В современной фармакологии группу интерферонов относят к иммуномодуляторам, а рибавирин – к противовирусным ЛС, обладающим расширенным спектром действия. Для лечения гепатита С используется интерферон- α – цитокин, выделяемый лейкоцитами. Считается, что в комбинации с рибавирином именно интерферон в большей степени обладает противовирусным действием. Он связывается с рецепторами на мембране гепатоцитов и стимулирует процесс димеризации белков, обеспечивающий активацию Janus-киназы (Just Another Kinase) и тирозинкиназы,

которые фосфорилируют цитоплазматические активаторы транскрипционных белков (STAT). STAT1 и STAT2 димеризуют и связывают регуляторный фактор 9 интерферона (IRF9), создавая большой комплекс, который транслоцируется в ядро, где связывается с элементами, стимулированными интерфероном на ДНК. Это взаимодействие вызывает транскрипцию нескольких мРНК, стимулированных интерфероном, которые выходят из ядра и кодируют белки, изменяющие метаболизм клеток, препятствующие репликации вируса, синтезу вирусных белков и его сборке. Ключевыми противовирусными ферментами являются 2',5'-олигоаденилатсинтетаза, активирующая антивирусные РНКазы; РНК-специфическая аденозиндезаминаза, редактирующая вирусную РНК и протеинкиназа R, инактивирующая трансляцию белка из вирусной мРНК.

Интерферон- α также индуцирует экспрессию генов, приводящих к активации естественных киллерных клеток, созреванию дендритных клеток, пролиферации Т-клеток памяти и предотвращению апоптоза Т-клеток [12, 13].

Рибавирин – гликозид D-рибозы и 1H-1,2,4-триазол-3-карбоксамида (рисунок 1). Данное ЛС проникает внутрь инфицированной вирусом клетки, фосфорилируется до моно-, ди- и трифосфатов. Трифосфат ингибирует РНК-полимеразу, останавливая репликацию вируса. Включение ненатурального нуклеотида является неосновным механизмом действия рибавирина. Основную роль в противовирусном действии данного ЛС играет ингибирование инозин 5'-монофосфат (IMP) дегидрогеназы. IMP-дегидрогеназа катализирует превращение IMP в ксантозин 5'-монофосфат (ХМР), имеющее важное значение для биосинтеза пуриновых моноклетотидов, в основном гуанозинтрифосфата. С этим механизмом связаны иммунодепрессивное действие рибавирина и ряд побочных эффектов, возникающих в процессе лечения [14, 15].

Рибавирин быстро всасывается при пероральном применении, его максимальная концентрация в плазме крови достигается через 1,5 часа. Биодоступность при приеме внутрь приблизительно равна 50 % (из-за эффекта первого прохождения через печень). Рибавирин практически не связывается с белками плазмы крови, может накапливаться в эритроцитах. Для него характерна очень большая величина кажущегося объема распределения (около 2000 л) и периода полувыведения. Метаболизируется в печени путём фосфорилирования, экскретируется преимущественно с мочой [16].

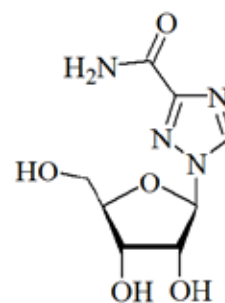


Рисунок 1. – Структурная формула рибавирина

Ингибиторы протеазы NS3/NS4a I поколения

Данная группа ЛС создавалась на основе design-подхода. Вначале была открыта «сернивая ловушка», основанная на взаимодействии этой аминокислоты с обычными электрофилами, такими как альдегиды, кетоны, трифторметилкетоны и R-кетоамиды, приводящем к ингибированию фермента. Затем было обнаружено несколько крупных пептидных молекул, содержащих R-кетоамид и эффективно ингибирующих протеазу HCV. Когда происходит атака Ser¹³⁹ протеазы NS3 пептидным агентом, то образуется стабильный, ковалентный и обратимый комплекс с ферментом (рисунок 2). Время, необходимое для стабильного образования ковалентных аддуктов, составляет около минуты. Однако для кетоамидного участка также характерно взаимодействие с нуклеофилами, присутствующими в других белках (белках человека), например, эластазе нейтрофилов или трипсине поджелудочной железы. Изучение коэффициента селективности помогло разработать селективные ингибиторы NS3/NS4a протеазы HCV, тем самым потенциально минимизируя побочные эффекты, которые могли бы быть при данной терапии [17–19].

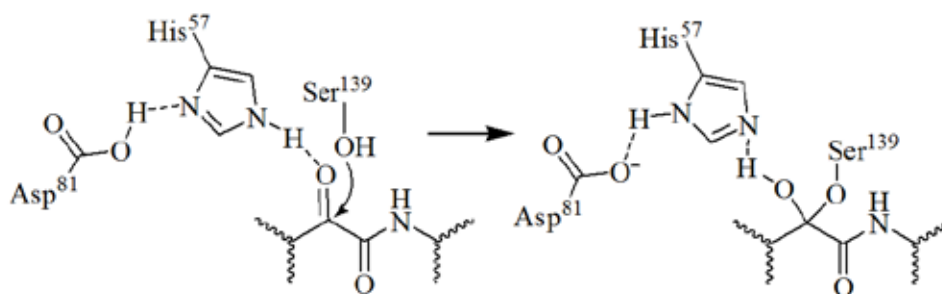


Рисунок 2. – Нуклеофильная атака α -кетонида Ser¹³⁹

Представителями ингибиторов протеазы NS3/NS4a I поколения являются боцепревир и телапревир. Боцепревир (рисунок 3) содержит в молекуле кетоамидный участок (1), с которым непосредственно взаимодействует Ser¹³⁹; остаток диметилциклопропилпролина (2) – фрагмент, обеспечивающий устойчивость ЛС к действию пептидаз (данный остаток принимает изогнутую конформацию, которая обеспечивает максимальное перекрытие фрагмента с Ala156 фермента, экзо-метил на циклопропановом кольце взаимодействует с имидазолом His57, а эндо-метил – с Ala¹⁵⁶ и Arg¹⁵⁵); трет-бутильные радикалы (3) обеспечивают устойчивость ЛС к действию пептидаз, вместе с глицильным участком (4) обуславливают гидрофобное взаимодействие лекарственного средства и фермента; остаток мочевины (5) (замена этого остатка на алкильную, арильную, амидную, карбаматную, сульфонамидную структуры уменьшает стабильность комплекса «боцепревир-фермент»); циклобутилаланильный фрагмент (6) (замена циклобутильного радикала на циклы других размеров, таких как циклопентил или циклогексил, или на арильный радикал уменьшает способность кетоамидного участка к нуклеофильному замещению, т.к. данные циклы слишком велики для белкового кармана, также циклобутилаланиновая группа отвечает за избирательность боцепревира в отношении протеаз вируса и человека).

Наличие amino- и кетогрупп в молекуле боцепревира обеспечивает дополнительную стабилизацию образующегося ковалентного комплекса за счёт образования водородных связей между ферментом и ЛС. Сочетание гидрофобных взаимодействий и образования большого количества

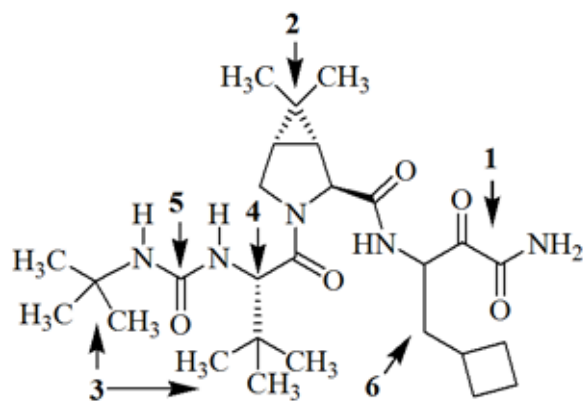


Рисунок 3. – Связь структуры и действия для боцепревира

водородных связей приводит к увеличению связывающей способности и селективности боцепревира по отношению к NS3/NS4a протеазе HCV [19–22].

Ещё одним ингибитором протеазы NS3/NS4a I поколения является телапревир. Структурная формула данного вещества показана на рисунке 4. В молекуле боцепревира присутствует кетоамидный участок (1), непосредственно с которым взаимодействует Ser¹³⁹; а также группы, образующие водородные связи с молекулой ингибируемого фермента: NH-группа (2), образующая водородную связь с карбоксилатом Lys¹⁵⁵; карбонильная группа (3) – с NH-группой Ala¹⁵⁷, NH-группа – с карбониллом Ala¹⁵⁷, карбонильная группа (5) – с NH-группой Cys¹⁵⁹ [23].

Боцепревир и телапревир всасываются в тонкой кишке. Максимальная концентрация достигается в плазме через 4,5 часа. Для телапревира уровень концентрации выше на 20 % при приеме пищи с высоким содержанием жиров. Связывание с белками – 54–77 %. Метаболизируются в печени цитохромом P450 (CYP3A4). Метаболиты

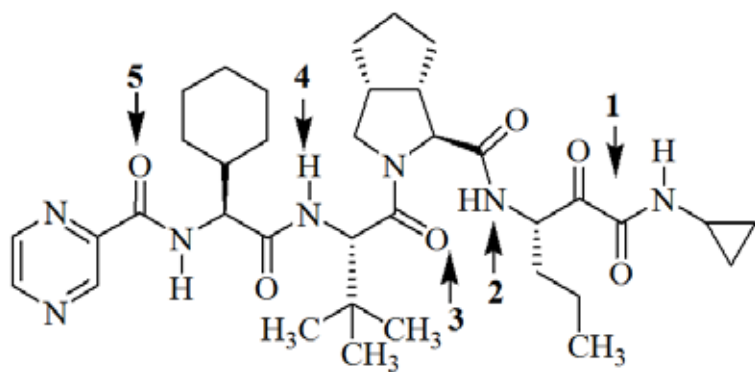


Рисунок 4. – Связь структуры и действия для телапревира

выводятся почками. Период полувыведения составляет 4–5 часов [24, 25].

Ингибиторы протеазы NS3/NS4a I поколения разрабатывались для монотерапии при лечении гепатита С, вызванного HCV генотипом 1. Но со временем вирус стал вырабатывать резистентность к данным ЛС. Замена в структуре фермента остатка Lys¹⁵⁵ на Thr привела к тому, что гидроксильная группа боковой цепи Thr образовала водородную связь с боковой цепью Asp⁸¹. Замена Lys¹⁵⁵ на Arg приводит к уменьшению взаимодействий между ферментом и ингибитором, т.е. уменьшает прочность связывания. Поэтому при использовании ингибиторов протеазы NS3/NS4a I поколения назначают комбинацию Peg-IFNα/рибавирин [26].

Ингибиторы протеазы NS3/NS4a II поколения

Данная группа ЛС отличается от ингибиторов I поколения механизмом взаимодействия с протеазой. Если боцепревир и телапревир участвуют в реакции нуклеофильного замещения с образованием стабильного ковалентного комплекса, то ингибиторы II поколения вступают в ионное взаимодействие с активным сайтом. Первым ингибитором протеазы NS3/NS4a II поколения является фалдапревир (рисунок 5).

На основе фалдапревира разработаны симепревир, паритапревир, grazопревир, одобренные FDA. Асунапревир не имеет

регистрации FDA, однако одобрен в Японии и в настоящее время используется в комбинации с даклатасвиром и Peg-IFNα/рибавирином в некоторых странах [27].

Структура симепревира показана на рисунке 6. В молекуле данного вещества присутствуют: макроцикл (1), влияющий на взаимодействие аминокислотных остатков в активном центре фермента; ацилсульфонамидная группа (2), связывающаяся с высококонсервативными остатками активного сайта, что обеспечивает дополнительную стабилизацию комплекса; хинолиновое ядро, обеспечивающее гидрофобную связь с десольватированной алифатической частью боковой цепи Arg¹⁵⁵, полученной в результате образования солевого мостика между Arg¹⁵⁵ и Asp¹⁶⁸; тиазольное ядро, необходимое для защиты хинолинового кольца от действия активных форм кислорода, приводящего к образованию токсичных продуктов.

Для симепревира характерна очень высокая степень связывания с белками плазмы крови (99 %). Величина периода полувыведения для него составляет приблизительно 40 часов, поэтому ЛС принимают один раз в сутки [28].

Структурные формулы асунапревира и паритапревира приведены на рисунке 7.

Асунапревир по многим характеристикам схож с симепревирином. Его отличительной особенностью является неплотный контакт с ферментом при большом количестве межмолекулярных взаимодействий.

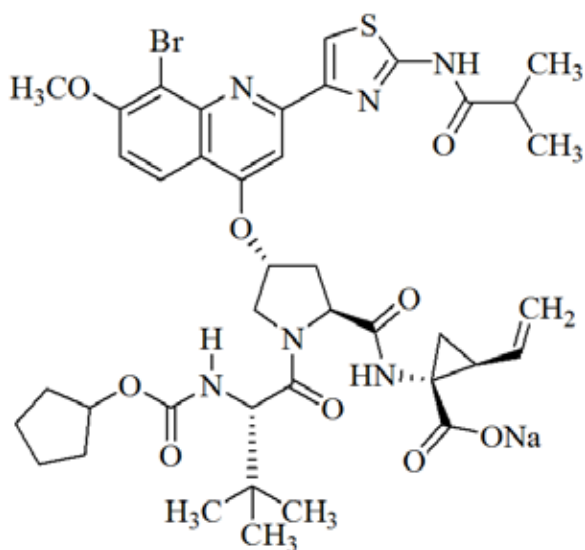


Рисунок 5. – Структурная формула фалдапревира

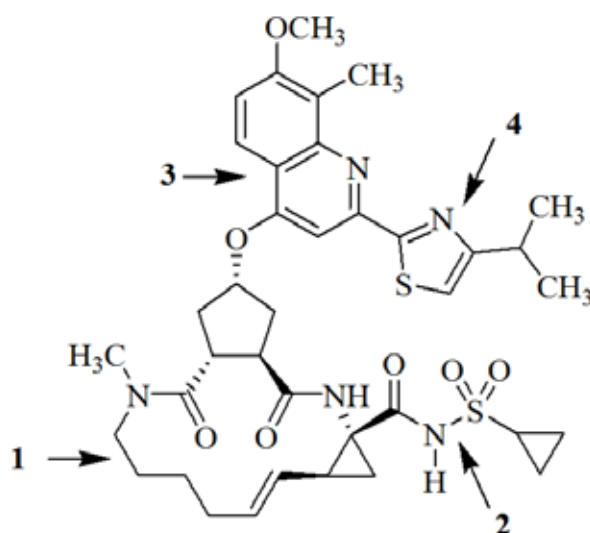


Рисунок 6. – Связь структуры и действия для симепревира

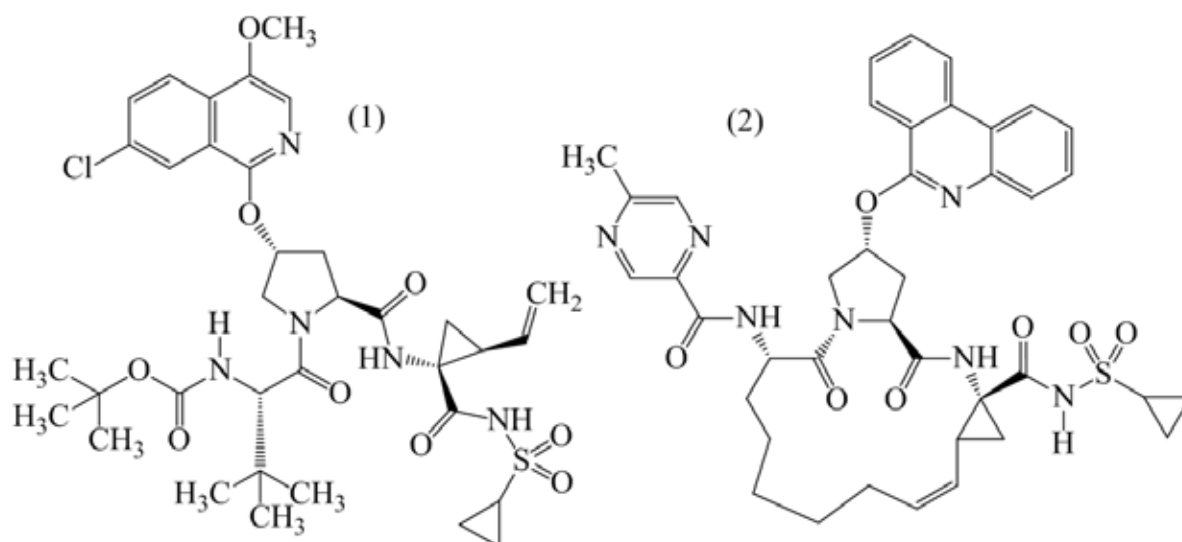


Рисунок 7. – Структурные формулы асунапревира (1) и паритапревира (2)

Это приводит к неэффективности монотерапии, в процессе лечения развивается резистентность [29, 30].

При модификации структуры боцепревира получен нарлапревир (рисунок 8). Введение в циклогексильный фрагмент трет-бутилсульфоновой группы повысило противовирусную активность. н-Бутильный фрагмент в молекуле данного вещества может быть заменён на арильный или арилалкильный. Замена циклопропильного радикала на циклы других размеров, таких как цикlopентил или циклогексил, уменьшает эффективность. Замена на трифторнорвалин приводит к усилению активности и селективности, но и приводит к увеличению токсичности.

Нарлапревир следует принимать во время приёма пищи, максимальная его концентрация в крови человека достигается

через 3–5 ч. Связывание с белками плазмы крови составляет 87–90 %. Метаболизируется в печени цитохромом P450 (CYP3A4), экскретируется через ЖКТ [31–33].

Большинство представителей ингибиторов II поколения являются макроциклическими соединениями. Существует два вида макроциклов: P1–P3 (симепревир и паритапревир) и P2–P4 (гразопревир). Цифра обозначает расположение аминокислоты или её видоизменённой структуры в ундекапептиде, на основе которого были созданы все ингибиторы сериновой протеазы. Практически у всех соединений P1 – глицин, P2 – пролин. На рисунке 9 на примере гразопревира указано расположение данных участков, образующих макроциклы.

Гразопревир – один из наиболее мощных ингибиторов NS3/NS4a. Уникальное

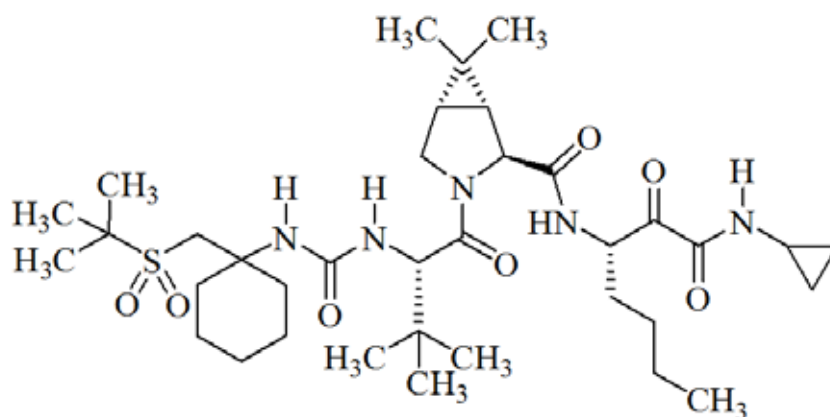


Рисунок 8. – Структурная формула нарлапревира

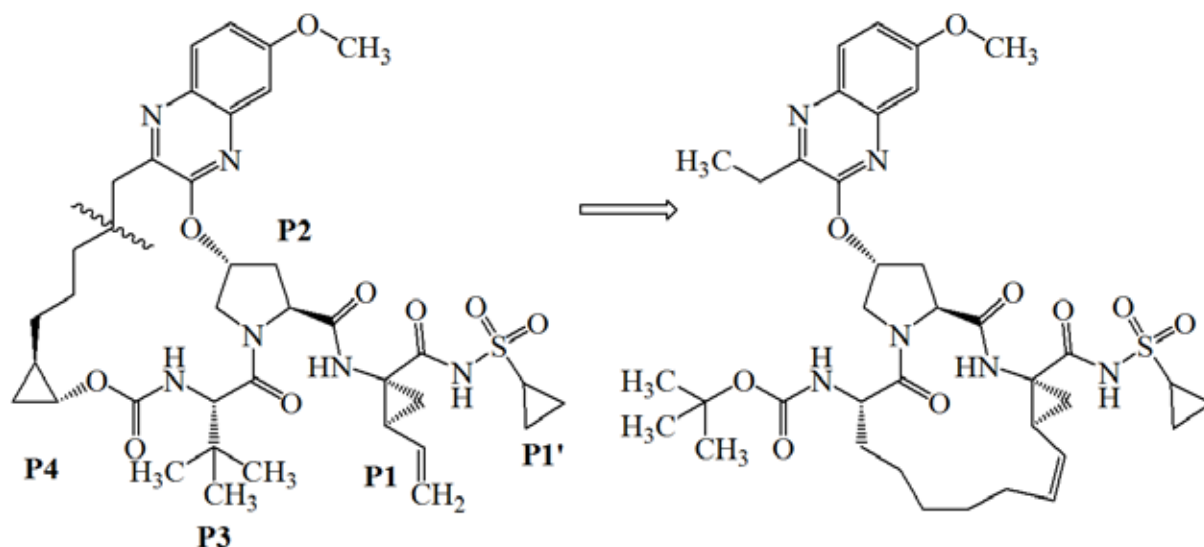


Рисунок 9. – Структурные формулы гразопревира и его аналога

взаимодействие P2-хиноксалина с остатками каталитической триады протеазы приводит к отсутствию прямого контакта с Arg¹⁵⁵ и Asp¹⁶⁸. Однако из-за стерических столкновений большого P2-P4 макроцикла с Ala156 гразопревир эффективен только при наличии мутаций в области Arg¹⁵⁵ и Asp¹⁶⁸ и практически неэффективен, если изменения происходят в участке Ala¹⁵⁶. В настоящее время на основе данного соединения ведутся поиски новых ЛС, которые обладали бы улучшенным профилем резистентности. На рисунке 9 представлен P1-P3 макроциклический аналог гразопревира. Хотя это соединение обладает меньшей активностью, чем его предшественник, но наличие гибкого P2-хиноксалинового фрагмента обеспечивает полную индифферентность лекарственного средства к мутациям в трёх основных областях.

Одним из перспективных направлений в создании новых ЛС является объединение двух вышеупомянутых структур с образованием P1-P3 – P2-P4 бисмакроцикла и P2-спироциклизация. P2-спироциклизация необходима для снижения энтропийных затрат в процессе взаимодействия протеазы и ингибитора, имеющего в своей структуре эфирсвязанную с P2-пролином биарильную группу. Введение метильной группы в P1'-циклопропилацилсульфонамид и замена P4-циклопропана на цикlopentan улучшили показатели фармакокинетики [34–36].

Ингибиторы белка NS5a

Механизм действия данной группы ЛС связан с ингибированием процесса димеризации белка NS5a, необходимого для начала репликации вируса. Ингибитор связывается с участком АН фрагмента D1, изменяя его конформацию и нарушая процесс ассоциации белка с мембраной. Без ассоциации димер не образуется, репликация не происходит. К ингибиторам белка NS5a относятся даклатасвир, ледипасвир, омбитасвир.

Даклатасвир (рисунок 10) содержит в молекуле бифенильный фрагмент. Связывание одного фенильного радикала со вторым в п-положении и создание бисистемы привели к усилению связывания ингибитора в АН участке. Такое строение препятствует координационному связыванию димеров при помощи ионов Zn²⁺ [37]. Введение галогенов в имидазольное кольцо увеличивает активность, но, в то же время, и токсичность вещества. Пролин-валин-карбаматный фрагмент обеспечивает плотный контакт даклатасвира с молекулой белка [38, 39].

Даклатасвир хорошо и быстро всасывается в ЖКТ, его биодоступность снижается при приёме жирной пищи. Связывание с белками плазмы крови составляет 99 %. Даклатасвир частично метаболизируется в печени цитохромом P450 (CYP3A4), экскретируется, в основном, через ЖКТ в неизменном виде. Величина периода полувыведения составляет около 15 часов [40].

Ледипасвир (рисунок 11) является очень сильным ингибитором NS5a (в 1000 раз сильнее даклатасвира *in vitro*). Этот факт объясняется заменой дифенильного фрагмента на дифторфлуореновый. Ледипасвир применяется в комбинации с софосбувиром. По многим характеристикам ледипасвир похож на даклатасвир [41, 42].

Структурная формула омбитасвира

приведена на рисунке 12. Для подавления димеризации белка NS5a необходима симметричная димерная структура ингибитора. Введение трет-бутильного радикала в один из фенильных фрагментов увеличило эффективность. (2S,5S)-Изомер омбитасвира эффективнее (2R,5R)-изомера примерно в 10 раз. Омбитасвир используется только в виде комбинированного лекарственного средства [43].

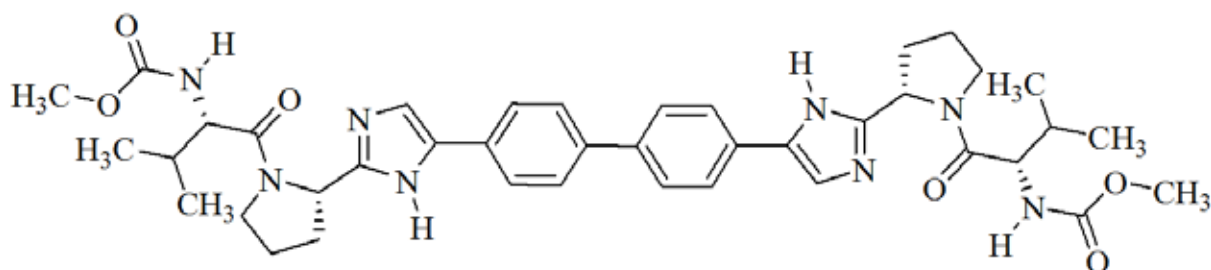


Рисунок 10. – Структурная формула даклатасвира

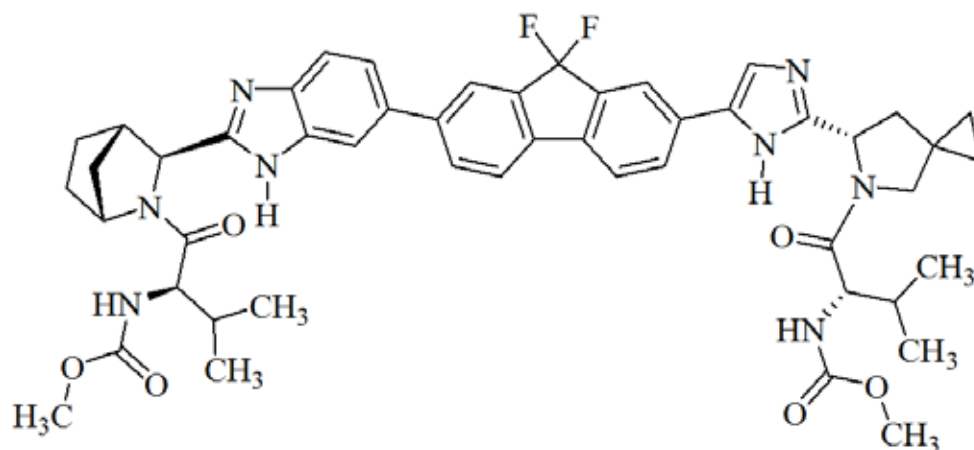


Рисунок 11. – Структурная формула ледипасвира

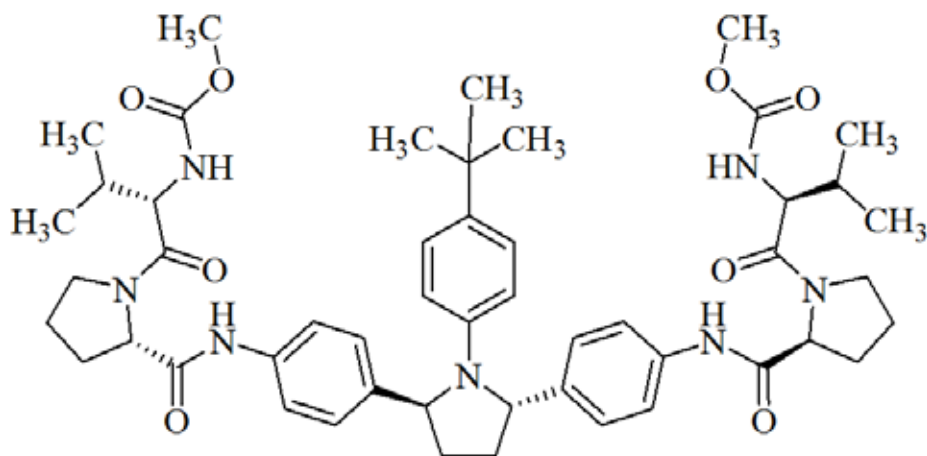


Рисунок 12. – Структурная формула омбитасвира

На сегодняшний день элбасвир (рисунок 13) и велпатасвир (рисунок 14) используются только в комбинации с гразопревиром и софосбувиром соответственно. Структуры этих лекарственных веществ используются для создания новых ЛС широкого спектра активности

(охватывающие все генотипы HCV). Например, одно из направлений – это поиск подходящих Z-групп и соответствующих заместителей, а также заместителей в 7 положении. Z-группа – гетероарильный или арильный (как у элбасвира) радикалы. Из-за ограниченных возможностей заме-

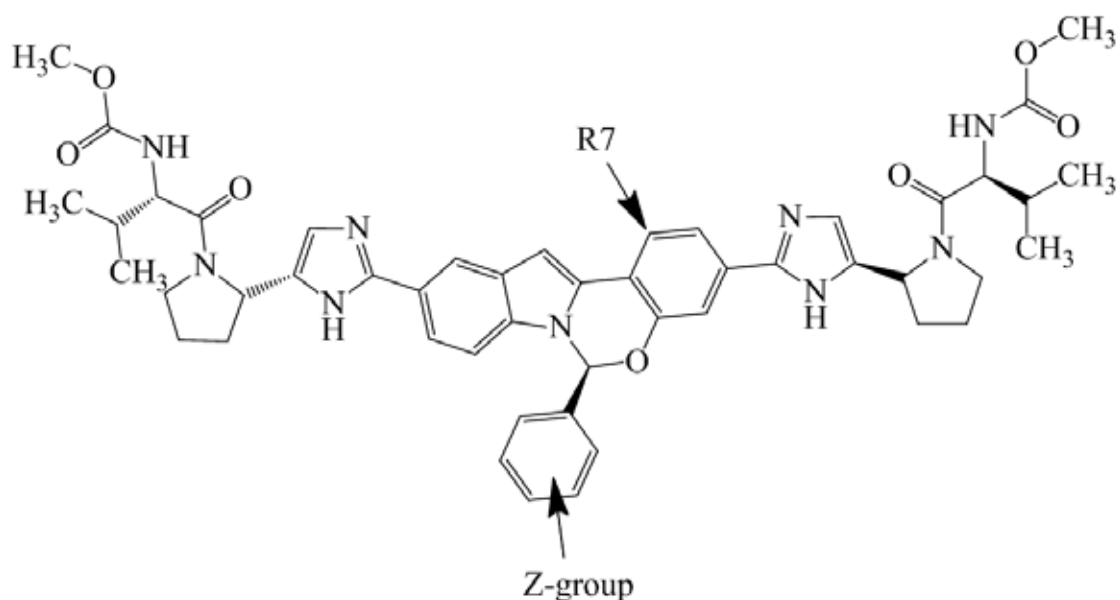


Рисунок 13. – Структурная формула элбасвира

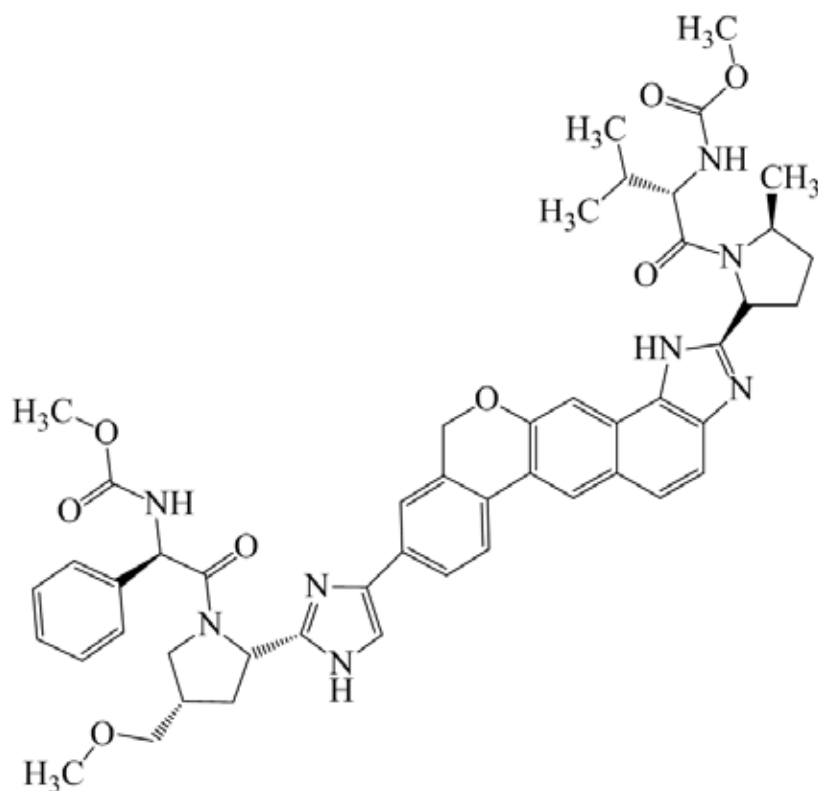


Рисунок 14. – Структурная формула велпатасвира

щения в о-положении фенильной группы заместители могут находиться только в м- и п-положениях. Электроноакцепторные радикалы снижают фармакологическую активность, поэтому наиболее приемлемы электронодонорные заместители. Хотя введение в м- или п-положение $-\text{CF}_3\text{O}$ показывает довольно хороший профиль активности. В положении 7 допускается наличие только $-\text{F}$ [44, 45].

Ингибиторы NS5b полимеразы

Ингибиторы вирусных полимераз являются самым крупным классом одобренных противовирусных лекарственных средств, наибольшее число их представлено нуклеозидными аналогами. Способ действия нуклеозидных ингибиторов основан на преждевременном прекращении синтеза вирусной РНК. После внутриклеточного фосфорилирования 5'-трифосфатные метаболиты конкурируют за включение в вирусные РНК-зародышевые цепи, что предотвращает дальнейшее расширение цепи путём добавления следующего нуклеозидтрифосфата. Это приводит к образованию неполных (нефункциональных) вирусных цепей РНК. В целом, противовирусная активность ингибиторов нуклеозидов определяется преимущественно способностью к образованию водородной связи между нуклеозидтрифосфатом и активным сайтом вирусной полимеразы [46].

Софосбувир (рисунок 15) является нуклеозидным ингибитором NS5b полимеразы.

Исходным веществом для создания софосбувира послужил 2'-метилуридин.

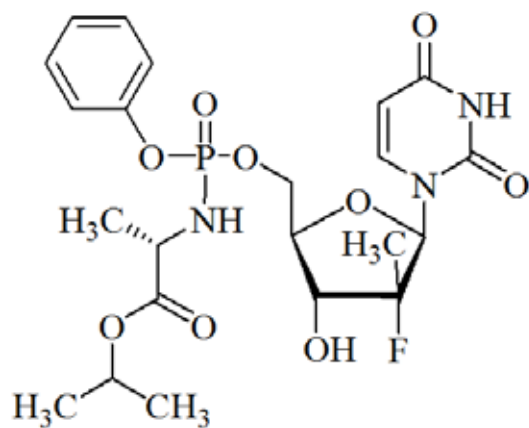


Рисунок 15. – Структурная формула софосбувира

При проведении испытаний *in vitro* этот нуклеозид показал противовирусный эффект при достаточно высокой концентрации. Введение во второе положение рибофуранозы атома фтора вызвало потерю активности. В дальнейшем в молекулу была введена фосфоамидатная группа, которая привела к появлению противовирусной активности и увеличила биодоступность. Добавление фенильной группы увеличило период полувыведения, что позволило использовать ЛС один раз в сутки.

Софосбувир представляет собой пролекарство, которое метаболизируется в печени с образованием β -D-2'-дезоксид-2'- α -фтор-2'- β -C-метилуридин-5'-монофосфата. Превращение монофосфатной формы в активный трифосфат включает в себя четыре ферментативных и одну неферментативную стадию. Первая стадия предполагает гидролиз катепсином А (CatA) или карбоксилэстеразой 1 (CES1) сложноэфирной группы, образованной карбоксильной группой. Вторая стадия включает неферментативную быструю химическую активацию, приводящую к получению аланилфосфатного промежуточного соединения. Во время третьей стадии происходит дезаминирование клеточным ферментом гистидин-триад-нуклеотид-связывающим белком 1, а последние две стадии, приводящие к активной трифосфатной форме, представляют собой фосфорилирование, катализируемое киназами клеточной киназы и киназой нуклеозиддифосфаткиназы. После превращения в трифосфатную форму уридин-нуклеотид используется как неправильный субстрат для полимеразы NS5B, вызывая прекращение роста цепи и репликации РНК [47, 48].

Софосбувир обладает наиболее высокой эффективностью среди всех пероральных лекарственных средств, активных в отношении HCV, и повышенной устойчивостью к развитию вирусной резистентности. Он входит в состав безинтерфероновых схем лечения гепатита С, обладающих клинически доказанной эффективностью.

Софосбувир хорошо и довольно быстро всасывается в ЖКТ. Связывание с белками плазмы крови – около 60%. Метаболизируется в печени с образованием фармакологически активного трифосфата. Выводится преимущественно с мочой [48, 49].

Дасабувир (рисунок 16) – ненуклеозидный представитель ингибиторов NS5b

полимеразы. Данное лекарственное средство является производным фенилпиримидина. Наличие этого фрагмента в молекуле обуславливает прочное связывание с доменом «ладонь» полимеразы. Изменение конформации активного центра фермента приводит к предотвращению транскрипции и ингибированию репликации вируса [50].

Дасабувир применяется только в комплексной терапии вместе с омбитасвиром, паритапревиром, ритонавиром (антиретровирусное лекарственное средство, не действующее на HCV, применяется в качестве «фармакокинетического усилителя», который за счёт ингибирования метаболизма в печени паритапревира повышает его концентрацию в крови и тем самым усиливает эффект). Такая комбинация предназначена для реализации безинтерфероновой терапии за счёт различных механизмов действия и непересекающегося профиля резистентности [51, 52].

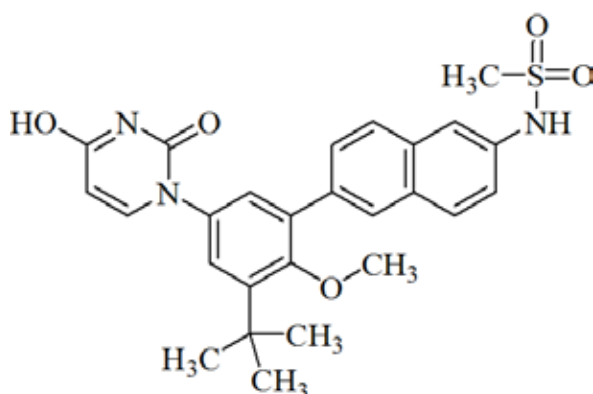


Рисунок 16. – Структурная формула дасабувира

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вирусный гепатит С представляет собой серьёзную проблему общественного здравоохранения, поэтому разработка лекарственных средств для лечения данного заболевания является актуальной задачей. В течение последнего десятилетия создан и внедрен в клиническую практику ряд лекарственных средств, обладающих прямым действием на белки HCV, что привело к настоящему прорыву в лечении гепатита С. Среди них можно выделить три основные группы: ингибиторы протеазы NS3/NS4a, ингибиторы белка NS5a, ингибиторы NS5b полимеразы.

SUMMARY

H. S. Lahodzich, A. K. Zharnasek
ANTIVIRAL MEDICINAL PRODUCTS
FOR THE TREATMENT OF HEPATITIS C

The aim of the work is to review the chemical structure and its relationship with the pharmacological activity of medicinal products used for the treatment of hepatitis C.

The information about the structure and life cycle of the hepatitis C virus (HCV), as well as the classification of medicinal products used for the treatment of hepatitis C is presented in the article. The chemical structure is described and the structure–activity relationship for medicinal products of indirect (pegylated interferon alpha, ribavirin) and direct activity of is shown. There are 3 main classes of direct-action antivirals used for the treatment of hepatitis C: the first generation (boceprevir, telaprevir) and the second generation (asunaprevir, grazoprevir, narlaprevir, paritaprevir, simeprevir) NS3/4A protease inhibitors; NS5a protein inhibitors (velpatasvir, daclatasvir, ledipasvir, ombitasvir, elbasvir), nucleoside (sofosbuvir) and non-nucleoside (dasabuvir) NS5a polymerase inhibitors.

Keywords: hepatitis C virus (HCV), hepatitis C, direct-action antivirals, NS3/4A protease inhibitors, NS5a protein inhibitors, NS5a polymerase inhibitors, structure-activity relationship.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jin, G. Chemical genetics-based development of small molecules targeting hepatitis C virus / G. Jin, J. Lee, K. Lee // Arch. Pharm. Res. – 2017. – Vol. 40, № 9. – P. 1021–1036.
2. Inhibitors of the Hepatitis C Virus Polymerase; Mode of Action and Resistance / A. A. Eltahla [et al.] // Viruses. – 2015. – Vol. 7, № 10. – P. 5206–5224.
3. The design of drugs for HIV and HCV [Electronic resource] / E. de Clercq // Nature Reviews Drug Discovery. – 2007. – Vol. 6. – P. 1001–1018.
4. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line / V. Lohmann [et al.] // Science. – 1999. – Vol. 285, № 5424. – P. 110–113.
5. Hepatitis C Virus Replication in Mice with Chimeric Human Livers / D. F. Mercer [et al.] // Nature Medicine. – 2001. – Vol. 7. –

P. 927–933.

6. Comparative features of hepatitis C virus infection in humans and chimpanzees / C. M. Walker // Springer Semin. Immunopathol. – 1999. – Vol. 19, № 1. – P. 85–98.

7. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus / D. Lamarre [et al.] // Nature. – 2003. – Vol. 426. – P. 186–189.

8. Discovery of (1*R*,5*S*)-N-[3-Amino-1-(cyclobutylmethyl)-2,3-dioxopropyl]-3-[2(*S*)-[[[(1,1-dimethylethyl)amino]carbonyl]amino]-3,3-dimethyl-1-oxobutyl]-6,6-dimethyl-3-azabicyclo[3.1.0]hexan-2(*S*)-carboxamide (SCH 503034), a Selective, Potent, Orally Bioavailable Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor: A Potential Therapeutic Agent for the Treatment of Hepatitis C Infection / S. Venkatraman [et al.] // J. Med. Chem. – 2006. – Vol. 49, № 20. – P. 6074–6086.

9. Николаева, Л.И. Вирус гепатита С: антигены вируса и реакция на них иммунной системы макроорганизма: информационно-методическое пособие / Л. И. Николаева. – Новосибирск: «Вектор-Бест», 2009. – 80 с.

10. Hepatitis C virus infection / P. M. Manns [et al.] // Nature Reviews Disease Primers. – 2017. – Vol. 3, Article Number 17006.

11. Hepatitis C guidance: AASLD–IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus / R. T. Chung [et al.] // Hepatology. – 2015. – Vol. 62, N 3. – P. 932–954.

12. Hoofnagle, J. H. Peginterferon and Ribavirin for Chronic Hepatitis C / J. H. Hoofnagle, L. B. Seeff // N. Engl. J. Med. – 2006. – Vol. 355. – P. 2444–2451.

13. Price, J. C. Treatment of hepatitis C in liver transplant patients: interferon out, direct antiviral combos in / J. C. Price, N. A. Terrault // Liver Transplantation. – 2015. – Vol. 21, № 4. – P. 423–434.

14. Sustained responders have better quality of life and productivity compared with treatment failures long after antiviral therapy for hepatitis C / A. A. John-Baptiste [et al.] // The American Journal of Gastroenterology. – 2009. – Vol. 104. – P. 2439–2448.

15. Shu, Q. Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) as a target in drug discovery / Q. Shu, V. Nair // Medical Research Reviews. – 2008. – Vol. 28, № 2. – P. 219–232.

16. Glue, P. The clinical pharmacology of

ribavirin / P. Glue // Semin. Liver Dis. – 1999. – Vol. 19, Suppl 1. – P. 17–24.

17. Molecular Mechanism by Which a Potent Hepatitis C Virus NS3-NS4A Protease Inhibitor Overcomes Emergence of Resistance / J. A. O'Meara [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 288, № 8. – P. 5673–5681.

18. Lin, C. HCV NS3-4A Serine Protease / C. Lin // Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology / edited by Seng-Lai Tan. – Horizonbioscience, 2006. – P. 163–206.

19. Discovery of SCH446211 (SCH6): a new ketoamide inhibitor of the HCV NS3 serine protease and HCV subgenomic RNA replication / S. L. Bogen [et al.] // J. Med. Chem. – 2006. – Vol. 49, № 9. – P. 2750–2757.

20. Depeptidization efforts on P3-P2' α -ketoamide inhibitors of HCV NS3-4A serine protease: effect on HCV replicon activity / S. L. Bogen [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2006. – Vol. 16, № 6. – P. 1621–1627.

21. Novel Potent Hepatitis C Virus NS3 Serine Protease Inhibitors Derived from Proline-Based Macrocycles / K. X. Chen [et al.] // J. Med. Chem. – 2006. – Vol. 49, № 3. – P. 995–1005.

22. Venkatraman, S. Discovery of boceprevir, a direct-acting NS3/4A protease inhibitor for treatment of chronic hepatitis C infections / S. Venkatraman // Trends in Pharmacological Sciences. – 2012. – Vol. 33, № 5. – P. 289–294.

23. Phenotypic and Structural Analyses of Hepatitis C Virus NS3 Protease Arg Variants Sensitivity To Telaprevir (Vx-950) and Interferon α / Y. Zhou [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 282, № 31. – P. 22619–22628.

24. Challenges in Modern Drug Discovery: A Case Study of Boceprevir, an HCV Protease Inhibitor for the Treatment of Hepatitis C Virus / F. G. Njoroge [et al.] // Acc. Chem. Res. – 2008. – Vol. 41, № 1. – P. 50–59.

25. Gambarin-Gelwan, M. Resistance-Associated Variants in Chronic Hepatitis C Patients Treated with Protease Inhibitors / M. Gambarin-Gelwan, I. M. Jacobson // Current Gastroenterology Reports. – 2012. – Vol. 14, № 1. – P. 47–54.

26. Discovery and development of telaprevir: an NS3-4A protease inhibitor for treating genotype 1 chronic hepatitis C virus / A. D. Kwong [et al.] // Nature Biotechnology. – 2011. – Vol. 29, № 11. – P. 993–1003.

27. Structure activity relationship study on a novel series of cyclopentane-containing macrocyclic inhibitors of the hepatitis C virus NS3/4A protease leading to the discovery of TMC435350 / P. Raboisson [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2008. – Vol. 18, № 17. – P. 4853–4858.
28. Discovery and development of simeprevir (TMC435), a HCV NS3/4A protease inhibitor / A. Rosenquist [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 57, № 5. – P. 1673–1693.
29. Preclinical Profile and Characterization of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor Asunaprevir (BMS-650032) / F. McPhee [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2012. – Vol. 56, № 10. – P. 5387–5396.
30. Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b-infected null responders / K. Chayama [et al.] // *Hepatology*. – 2012. – Vol. 55, № 3. – P. 742–748.
31. Pharmacokinetics of the New Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor Narlaprevir following Single-Dose Use with or without Ritonavir in Patients with Liver Cirrhosis / V. Isakov [et al.] // *Antimicrob. Agents and Chemother.* – 2016. – Vol. 60, № 12. – P. 7098–7104.
32. Preclinical Characterization of the Antiviral Activity of SCH 900518 (Narlaprevir), a Novel Mechanism-Based Inhibitor of Hepatitis C Virus NS3 Protease / X. Tong [et al.] // *Antimicrob. Agents and Chemother.* – 2010. – Vol. 54, № 6. – P. 2365–2370.
33. Antiviral activity of narlaprevir combined with ritonavir and pegylated interferon in chronic hepatitis C patients [Electronic resource] / J. de Bruijne [et al.] // *Hepatology*. – 2010. – Vol. 52, № 5. – P. 1590–1599.
34. Toward second generation hepatitis C virus NS3 serine protease inhibitors: Discovery of novel P4-modified analogues with improved potency and pharmacokinetic profile / A. Arasappan [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 52, № 9. – P. 2806–2817.
35. Design and Synthesis of P2–P4 Macrocycles Containing a Unique Spirocyclic Proline: A New Class of HCV NS3/4A Inhibitors / F. Velazquez [et al.] // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2016. – Vol. 7, N 12. – P. 1173–1178.
36. Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Inhibitors Incorporating Flexible P2 Quinoxalines Target Drug Resistant Viral Variants / A. N. Matthew [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 60, № 13. – P. 5699–5716.
37. Asymmetric Binding to NS5A by Daclatasvir (BMS-790052) and Analogs Suggests Two Novel Modes of HCV Inhibition / J. H. Nettles [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 57, № 23. – P. 10031–10043.
38. Persistence of resistant variants in hepatitis C virus-infected patients treated with the NS5A replication complex inhibitor daclatasvir / C. Wang [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57, № 5. – P. 2054–2065.
39. Novel Spiroketal Pyrrolidine GSK2336805 Potently Inhibits Key Hepatitis C Virus Genotype 1b Mutants: From Lead to Clinical Compound / W. M. Kazmierski // *J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 57, № 5. – P. 2058–2073.
40. Single-dose pharmacokinetics and safety of daclatasvir in subjects with renal function impairment / T. Garimella [et al.] // *Antiviral Therapy*. – 2015. – Vol. 20. – P. 535–543.
41. Discovery of ABT-267, a pangenotypic inhibitor of HCV NS5A / D. A. DeGoey [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 57, № 5. – P. 2047–2057.
42. Discovery of Ledipasvir (GS-5885): A Potent, Once-Daily Oral NS5A Inhibitor for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection / J. O. Link [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 57, № 5. – P. 2033–2046.
43. Stirnimann, G. Ombitasvir (ABT-267), a novel NS5A inhibitor for the treatment of hepatitis C // *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. – 2014. – Vol. 15, № 17. – P. 2609–2622.
44. Structure-activity relationships of proline modifications around the tetracyclic-indole class of NS5A inhibitors / L. Tong [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2016. – Vol. 26, № 21. – P. 5354–5360.
45. Aryl or heteroaryl substituted aminated derivatives of HCV NS5A inhibitor MK-8742 / W. Yu [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2016. – Vol. 26, № 15. – P. 3414–3420.
46. Structure-activity relationships of nucleoside analogues for inhibition of tick-borne encephalitis virus C / L. Eyer [et al.] // *Antiviral Research*. – 2016. – Vol. 133. – P. 119–129.
47. Keating, G. M. Sofosbuvir: first global approval / G. M. Keating, A. Vaidya // *Drugs*. – 2014. – Vol. 74, № 2. – P. 273–282.

48. Greig, S. L. Sofosbuvir/Velpatasvir: A Review in Chronic Hepatitis C / S. L. Greig // Drugs. – 2016. – Vol.76, № 16. – P. 1567–1578.

49. Keating, G. M. Ledipasvir/Sofosbuvir: A Review of Its Use in Chronic Hepatitis C / G. M. Keating // Drugs. – 2015. – Vol.75, № 6. – P. 675–685.

50. In Vitro Activity and Resistance Profile of Dasabuvir, a Nonnucleoside Hepatitis C Virus Polymerase Inhibitor / W. Kati [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2015. – Vol. 59, № 3. – P. 1505–1511.

51. Deeks, E. D. Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir Plus Dasabuvir: A Review in Chronic HCV Genotype 1 Infection / E. D. Deeks // Drugs. – 2015. – Vol.75, № 9. – P. 1027–1038.

52. The Real-World Israeli Experience

of Treating Chronic Hepatitis C, Genotype 1 Patients with Advanced Fibrosis with Paritaprevir/Ritonavir/Ombitasvir, Dasabuvir with or without Ribavirin: A Large Multi-Center Cohort / E. Zuckerman [et al.] // Journal Of Hepatology. – 2016. – Vol. 64, № 2, Supplement. – P. S137.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов
медицинский университет»,
кафедра фармацевтической химии
с курсом ФПК и ПК,
e-mail: zharnasek@gmail.com,
Жерносок А. К.

Поступила 13.05.2019 г.

И. А. Малаев, М. Л. Пивовар

АДДИТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ: ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ И ФАРМАЦИИ

*Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь*

Аддитивные технологии в настоящее время все шире используются в медицине для создания протезов и ортезов, макетов органов и тканей, а также в фармации для производства персонифицированных лекарственных средств. В статье дана краткая характеристика методов аддитивного производства: экструзионного, стереолитографического, порошкового, ламинирования и струйного. Изложены принципы 3D-печати изделий данными методами. Проведен обзор литературных источников, освещающих применение аддитивного производства в медицине и фармации. Выделены наиболее важные в практическом отношении методы 3D-печати, такие как экструзионный (FDM), стереолитографический (SLA, DLP), порошковый (EBM, SLM, SLS, DMLS), а также струйный (3DP). Освещены возможности использования аддитивных технологий для производства лекарственных средств.

Ключевые слова: аддитивные технологии, методы 3D-печати, 3D-технологии в медицине и фармации.

ВВЕДЕНИЕ

Процесс послойного создания твердого объекта осуществлен впервые в 1986 году американским изобретателем Чарльзом Халлом, тогда же им был запатентован метод 3D-печати и была основана компания «3D Systems». В 1988 году она начала серийное производство 3D-принтеров модели «SLA-250» [1].

Несмотря на столь большой период

времени, 3D-технологии получили широкое коммерческое распространение лишь в начале 2010-х годов, что было обусловлено низкой производительностью, качеством печати, высокой стоимостью оборудования, а также несовершенством цифровых технологий на начальных этапах развития 3D-печати.

Аддитивное производство на сегодняшний день используется в автомобильной, аэрокосмической, пищевой промыш-